

Title	Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines
Author(s)	木村, 晃子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46177
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 木 村 晃 子

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19752 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 7 月 22 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines
(ヒト卵巣癌細胞株における、Akt カスケードを介したエストロゲンによる hTERT の発現増加とリン酸化のメカニズム)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 村田 雄二

(副査)

教 授 高井 義美 教 授 奥山 明彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

エストロゲン補充療法は乳癌、子宮内膜癌のみならず卵巣癌のリスクも上昇させるといわれるが、そのメカニズムは不明である。近年注目されている発癌標的分子の一つに telomerase が挙げられ、エストロゲンは乳癌細胞、子宮内膜癌細胞、そして上皮性卵巣癌細胞において telomerase を活性化することが報告されている。telomerase は細胞分裂毎に短小化する telomere DNA の複製伸長に関与する reverse transcriptase で、染色体の安定性に必要である。また telomerase は、癌細胞において広く活性化されているが、体細胞では認められないことより、細胞の不死化や癌化への関与が考えられている。telomerase 活性化は subunit の hTERT (human telomerase reverse transcriptase) の活性に依存し、種々の上皮性悪性腫瘍において、hTERT の発現増加と活性上昇が関与していることが報告されてきた。今回、ヒト上皮性卵巣癌細胞 Caov-3 を用い、エストロゲンが telomerase を活性化するかどうか、hTERT の発現増加と活性上昇が見られるかどうか、及びそれらのメカニズムについて検討した。

【方法】

ヒト卵巣乳頭状腺癌の細胞株 Caov-3 を用い、 17β -estradiol (E2) により telomerase が活性化されるかどうか、stretch PCR 法にて検討した。E2 の hTERT 発現に対する影響は半定量 RT-PCR 法と、種々の大きさのプロモーターレポーター遺伝子を用いた luciferase 法にて検討した。E2 による Akt のリン酸化を Western blotting 法にて検討した。E2 による hTERT の発現増加に PI3K/Akt cascade を介しているかどうか、PI3K 阻害剤 (LY294002) を添加し、または dominant-negative Akt (DN-Akt) を強制発現させ、RT-PCR 法と luciferase 法にて検討した。PI3K/Akt の downstream にある転写因子 NF κ B が hTERT の発現に関与しているかどうか、I κ B α の阻害剤 (BAY 11-7082) を添加し、または核内移行ドメインを消失した変異 p50 (NF κ B subunit) を強制発現させ、luciferase 法にて検討した。hTERT はリン酸化され、核内に移行することにより酵素活性を発揮するが、hTERT が E2 によりリン酸化されるかどうかを Western blotting 法にて検討した。hTERT の核内移行に重要な 14-3-3 蛋白や p65 (NF κ B subunit) との結合が E2 により増強するかどうかを GST-14-3-3 fusion protein との binding 法や免疫沈降法にて検討した。E2 により hTERT が核内に移行するかどうか細胞内局在の変化をみるために、pCR3-hTERT-HA を強制発現させ、共焦点顕微鏡にて検討した。

【結果】

Caov-3 細胞において、10 nM E2 添加後 6 時間から telomerase 活性の上昇が観察され 24 時間で最大となり、この現象はエストロゲン受容体(ER)のアンタゴニストである ICI182,780 により抑制された。E2 により hTERT の mRNA 量は増加し、ICI182,780 にて抑制された。Estrogen response element (ERE) を欠損した hTERT 遺伝子プロモーター領域でも E2 による hTERT 転写活性の上昇が認められた。E2 により ER、Src、PI3K を介した Akt のリン酸化がみられた。LY294002 の添加や DN-Akt 強制発現により E2 による hTERT の発現増加が抑制された。BAY11-7082 の添加や変異 p50 の強制発現により E2 による hTERT の発現増加が抑制された。E2 による hTERT のリン酸化は添加後 30 分で認められ 24 時間後も持続し、ICI182,780 や LY294002 で抑制された。E2 により hTERT は 14-3-3 蛋白や p65 と結合し、LY294002 や ICI182,780 で抑制された。HA-hTERT は E2 添加後 30 分で核内に移行し 24 時間後も認められ、LY294002、ICI182,780、BAY11-7082 の添加で核内移行が抑制された。

【総括】

卵巣癌細胞株において、エストロゲンによる telomerase の活性化は、ERE を介した経路のみならず、PI3K/Akt/NF- κ B 経路を介した hTERT 発現増加による転写制御と、Akt を介した hTERT の活性上昇による転写後制御とも関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

エストロゲン補充療法は乳癌、子宮内膜癌のみならず卵巣癌のリスクも上昇させるといわれるが、そのメカニズムは不明である。近年注目されている発癌標的分子の一つに telomerase が挙げられ、エストロゲンは乳癌細胞、子宮内膜癌細胞、そして上皮性卵巣癌細胞において telomerase を活性化することが報告されている。telomerase は細胞分裂毎に短小化する telomere DNA の複製伸長に関与する reverse transcriptase で、染色体の安定性に必要である。また telomerase は、癌細胞において広く活性化されているが、体細胞では認められないことより、細胞の不死化や癌化への関与が考えられている。telomerase 活性化は subunit の hTERT (human telomerase reverse transcriptase) の活性に依存し、種々の上皮性悪性腫瘍において、hTERT の発現増加と活性上昇が関与していることが報告されてきた。今回、ヒト上皮性卵巣癌細胞 Caov-3 を用い、エストロゲンが telomerase を活性化することを確認し、hTERT の発現増加や活性上昇に、細胞内シグナル伝達の 1 つ PI3K/Akt 経路による制御が関与していることを示した。

以上のこの研究をまとめた論文により、博士(医学)の学位授与に値すると評価された。